

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-165684

(43)Date of publication of application : 14.06.1994

(51)Int.Cl. C12P 7/26
A23K 1/16
/(C12P 7/26
C12R 1:20)
(C12P 7/26
C12R 1:05)
(C12P 7/26
C12R 1:38)
(C12P 7/26
C12R 1:01)

(21)Application number : 05-070335 (71)Applicant : KAIYO BIO TECHNOL
KENKYUSHO:KK

(22)Date of filing : 29.03.1993 (72)Inventor : YOKOYAMA AKIHIRO
IZUMIDA HITOSHI
MIKI WATARU

(30)Priority

Priority number : 04263929 Priority date : 01.10.1992 Priority country : JP

(54) PRODUCTION OF 4-KETOZEAXANTHIN AND ITS USE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain 4-ketozeaxanthin useful as an agent for improving the color tone of cultured fish, etc., on an industrial scale at a low cost by culturing a 4-ketozeaxanthin-producing bacterial strain belonging to the genus *Flavobacterium* in a medium and separating the compound from the cultured product.

CONSTITUTION: 4-ketozeaxanthin useful as a color-tone improving agent such as a coloring component for cultured fish and shellfish (e.g. shrimp and red sea bream) and a color-tone improving agent for goldfish and fancy carp can be produced in high yield by culturing a bacterial strain belonging to the genus *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Hyphomonas* or *Caryophanon* and capable of producing 4-ketozeaxanthin [e.g. *Flavobacterium* sp. N-81106 (FERM P-12782)] in a medium and separating the compound from the cultured product.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision
of rejection]

[Kind of final disposal of application other
than the examiner's decision of rejection
or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-165684

(43)公開日 平成6年(1994)6月14日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 7/26		9282-4B		
A 2 3 K 1/16	3 0 3 Z	9123-2B		
// (C 1 2 P 7/26				
C 1 2 R 1:20)				
(C 1 2 P 7/26				

審査請求 未請求 請求項の数2(全 8 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平5-70335	(71)出願人	591001949 株式会社海洋バイオテクノロジー研究所 東京都文京区本郷二丁目35番10号
(22)出願日	平成5年(1993)3月29日	(72)発明者	横山 昭裕 静岡県清水市袖師町1900番地 株式会社海 洋バイオテクノロジー研究所清水研究所内
(31)優先権主張番号	特願平4-263929	(72)発明者	泉田 仁 静岡県清水市袖師町1900番地 株式会社海 洋バイオテクノロジー研究所清水研究所内
(32)優先日	平4(1992)10月1日	(72)発明者	幹 渉 静岡県清水市袖師町1900番地 株式会社海 洋バイオテクノロジー研究所清水研究所内
(33)優先権主張国	日本(JP)	(74)代理人	弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54)【発明の名称】 4-ケートゼアキサンチンの製造法及びその用途

(57)【要約】

【構成】 フラボバクテリウム属、アルカリゲネス属、シュードモナス属、アルテロモナス属、ヒポモナス属又はカリオフアノン属に属し、4-ケートゼアキサンチンを生産する能力を有する細菌を培地に培養し、培養物から4-ケートゼアキサンチンを採取することを特徴とする4-ケートゼアキサンチンの製造法、及び4-ケートゼアキサンチンを有効成分とする養殖魚介類の色調改善剤。

【効果】 従来入手が困難であった4-ケートゼアキサンチンを、極く一般的な培養装置により、高収率で容易に得ることができる。本発明の色調改善剤は、エビ、マダイ等の養殖魚介類における色揚げ成分、及びキンギョ、ニシキゴイ等の鑑賞魚の色調改善成分として有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 フラボバクテリウム(Flavobacterium) 属、アルカリゲネス(Alcaligenes) 属、シュードモナス(Pseudomonas) 属、アルテロモナス(Alteromonas) 属、ヒボモナス(Hyphomonas) 属又はカリオフアノン(Caryophanon) 属に属し、4-ケトゼアキサンチンを生産する能力を有する細菌を培地に培養し、培養物から4-ケトゼアキサンチンを採取することを特徴とする4-ケトゼアキサンチンの製造法。

【請求項2】 4-ケトゼアキサンチンを有効成分として含有することを特徴とする養殖魚介類の色調改善剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、微生物を利用した4-ケトゼアキサンチンの製造法、及び4-ケトゼアキサンチンを有効成分とする養殖魚介類の色調改善剤に関するものである。

【0002】

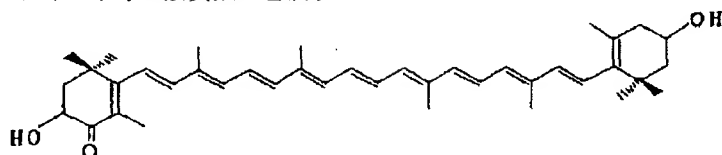
【従来の技術】従来より、エビ、マダイ等の養殖魚介類の色揚げや、キンギョ、ニシキゴイ等の鑑賞魚の色調改

善は、その商品価値を高めるために水産養殖業及び餌料製造業等の関係者の間で鋭意研究開発が進められている。一方、体表色素の構成成分であるカロテノイドの代謝、蓄積についても、水産学、化学、生化学の分野の研究者によって明らかにされている。秦ら(水産動物のカロテノイド、日本水産学会編、恒星社厚生閣、p.60、1978)は、キンギョ及びニシキゴイが、ゼアキサンチンを4-ケトゼアキサンチンを経由し、4-ケトゼアキサンチンに代謝し、体表に蓄積すると報告している。また、エビやマダイにおいても同様の代謝系を有することが報告(水産動物のカロテノイド、日本水産学会編、恒星社厚生閣、p.41、1978)されている。

【0003】しかし、4-ケトゼアキサンチンの入手については、高含量で蓄積している生物からの抽出、高効率で生産する微生物培養物からの抽出、効率的な有機合成法等が考えられるが、現在までそのいずれも報告されていない。また、4-ケトゼアキサンチンは次式：

【0004】

【化1】



【0005】で示される公知化合物であるが(Int. J. Biochem., 1, 438-444(1970))、産業上の用途は知られていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、従来入手が困難であった4-ケトゼアキサンチンを簡便に製造することができる方法を提供すると共に、その産業上の用途を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、4-ケトゼアキサンチンを生産する微生物について鋭意研究を行ったところ、特定の属に属する細菌が4-ケトゼアキサンチンを生産することを見出し、更に、4-ケトゼアキサンチンがエビ、マダイ等の養殖魚介類の色揚げ、及びキンギョ、ニシキゴイ等の観賞魚の色調改善に有効であることを見出し本発明を完成するに至った。

【0008】即ち、本発明の第一は、フラボバクテリウム(Flavobacterium)属、アルカリゲネス(Alcaligenes) 属、シュードモナス(Pseudomonas) 属、アルテロモナス(Alteromonas) 属、ヒボモナス(Hyphomonas) 属又はカリオフアノン(Caryophanon) 属に属し、4-ケトゼアキサンチンを生産する能力を有する細菌を培地に培養し、培養物から4-ケトゼアキサンチンを採取することを特徴とする4-ケトゼアキサンチンの製造法であり、本発明の第二は、4-ケトゼアキサンチンを有効成分として含

有することを特徴とする養殖魚介類の色調改善剤である。

【0009】以下、本発明を詳細に説明する。まず、4-ケトゼアキサンチンの製造法について説明する。4-ケトゼアキサンチン生産菌株としては、前記属に属し、4-ケトゼアキサンチン生産能を有する菌株であれば、いずれの菌株でも用いることができる。また、これらの菌株の人工的変異方法、例えば紫外線照射、X線照射、変異誘起剤処理等あるいは自然発生による変異株、また遺伝子操作、細胞融合による変異株でも、4-ケトゼアキサンチンを生産するものであれば、いずれも本発明に用いることができる。

【0010】代表的菌株を挙げれば、フラボバクテリウム(Flavobacterium)属細菌として Flavobacterium sp. N-81106 株、アルカリゲネス(Alcaligenes) 属細菌として Alcaligenes sp. PC-2 株、シュードモナス(Pseudomonas) 属細菌として Pseudomonas sp. PC-3 株、アルテロモナス(Alteromonas) 属細菌として Alteromonas sp. SD-402 株、ヒボモナス(Hyphomonas) 属細菌として Hyphomonas sp. PC-4 株、カリオフアノン(Caryophanon) 属細菌として Caryophanon sp. PC-5 株が挙げられる。

【0011】Flavobacterium sp. N-81106株の菌学的性質を以下に示す。

(1) 形態

菌の形・大きさ：桿状、 $0.9\mu\text{m} \times 1.2\mu\text{m}$

運動性：あり
鞭毛：周毛あり
細胞の多形成：なし
胞子の形成：なし
グラム染色：陰性

(2) 各培地における生育状況

肉汁寒天平板培養：非拡散性で光沢を有する、橙色の円形コロニーを形成する。
肉汁寒天斜面培養：非拡散性で光沢を有する、橙色の帯状に生育する。
肉汁液体培養：培地全体に均一に生育し、橙色を示す。
肉汁ゼラチン穿刺培養：穿刺孔を中心に表面に生育する。

【0012】(3) 生理学的性質

硝酸塩の還元：陽性
脱窒反応：陰性
インドールの生成：陰性
クエン酸の利用：陰性
色素の生成：脂溶性の赤橙色色素
ウレアーゼ活性：陰性
オキシダーゼ活性：陽性
カタラーゼ活性：陽性
β-グルコシダーゼ活性（エスクリン分解性）：陽性
β-ガラクトシダーゼ活性：陽性
生育の範囲：pH5～9、温度10～40℃
酸素に対する態度：好気性
海水耐性：陽性
O-Fテスト：酸化
糖類の同化能：
陽性：D-グルコース、D-マンノース、D-ガラクトース、D-フルクトース、乳糖、麦芽糖、ショ糖、グリコーゲン、N-アセチル-D-グルコサミン
陰性：L-アラビノース、D-マンニトール、イノシトール、L-ラムノース、D-ソルビトール
有機酸の同化能：
陽性：乳酸塩
陰性：クエン酸塩、リンゴ酸塩、グルコン酸塩、カブリン酸塩、コハク酸塩、アジピン酸塩
他の有機物の資化能
陽性：イノシン、ウリジン、グルコース-1-リン酸、グルコース-6-リン酸
陰性：ゼラチン、L-アルギニン、DNA、カゼイン

【0013】*Alcaligenes* sp. PC-2株の菌学的性質を以下に示す。

(1) 形態

菌の形・大きさ：桿状、 $0.4\mu\text{m}\times 1.7\mu\text{m}$
運動性：あり
鞭毛：周毛あり
細胞の多形成：なし
胞子の形成：なし

グラム染色：陰性

(2) 各培地における生育状況

肉汁寒天平板培養：非拡散性で光沢を有する、橙色の円形コロニーを形成する。
肉汁寒天斜面培養：非拡散性で光沢を有する、橙色の帯状に生育する。
肉汁液体培養：培地全体に均一に生育し、橙色を示す。
肉汁ゼラチン穿刺培養：穿刺孔を中心に表面に生育する。

【0014】(3) 生理学的性質

硝酸塩の還元：陰性
脱窒反応：陰性
インドールの生成：陰性
クエン酸の利用：陰性
色素の生成：脂溶性の赤橙色色素
ウレアーゼ活性：陰性
オキシダーゼ活性：陽性
カタラーゼ活性：陽性
β-グルコシダーゼ活性（エスクリン分解性）：陽性
β-ガラクトシダーゼ活性：陽性
生育の範囲：pH5～9、温度10～40℃
酸素に対する態度：好気性
海水耐性：陽性
O-Fテスト：酸化、発酵のいずれも示さない。
糖類の同化能：
陽性：D-グルコース、麦芽糖
陰性：L-アラビノース、D-マンノース、D-マンニトール、N-アセチル-D-グルコサミン
有機酸の同化能：
陽性：リンゴ酸塩
陰性：グルコン酸塩、カブリン酸塩、アジピン酸塩、クエン酸塩、酢酸フェニル
他の有機物の分解・同化能
陰性：ゼラチン、L-アルギニン

【0015】*Pseudomonas* sp. PC-3株の菌学的性質を以下に示す。

(1) 形態

菌の形・大きさ：桿状、 $0.6\mu\text{m}\times 1.3\mu\text{m}$
運動性：あり
鞭毛：極毛あり
細胞の多形成：なし
胞子の形成：なし
グラム染色：陰性

【0016】(2) 各培地における生育状況

肉汁寒天平板培養：ほとんど生育しない。
肉汁寒天斜面培養：ほとんど生育しない。
肉汁液体培養：ほとんど生育しない。
肉汁ゼラチン穿刺培養：ほとんど生育しない。
マリンアガー（Difco社製）平板培養：非拡散性で光沢を有する、橙色の円形コロニーを形成する。

マリンアガー (Difco社製) 斜面培養：非拡散性で光沢を有する、橙色の帯状に生育する。

マリンプロス (Difco社製) 培養：培地全体に均一に生育し、橙色を示す。

【0017】(3) 生理学的性質

硝酸塩の還元：陰性

脱窒反応：陰性

インドールの生成：陰性

クエン酸の利用：陰性

色素の生成：脂溶性の赤橙色色素

ウレアーゼ活性：陰性

オキシダーゼ活性：陽性

カタラーゼ活性：陽性

β -グルコシダーゼ活性 (エスクリン分解性)：陽性

β -ガラクトシダーゼ活性：陰性

生育の範囲：pH 5～9、温度10～40℃

酸素に対する態度：好気性

海水耐性：陽性

O-Fテスト：酸化、発酵のいずれも示さない。

糖類の同化能：

陽性：D-グルコース、麦芽糖

陰性：L-アラビノース、D-マンノース、D-マンニトール、N-アセチル-D-グルコサミン

有機酸の同化能：

陰性：グルコン酸塩、カプリン酸塩、アジピン酸塩、リンゴ酸塩、クエン酸塩、酢酸フェニル

他の有機物の分解・同化能

陰性：ゼラチン、L-アルギニン

【0018】*Alteromonas* sp. SD-402株の菌学的性質を以下に示す。

(1) 形態

菌の形・大きさ：桿状、 $0.4\mu\text{m} \times 1.6\mu\text{m}$

運動性：あり

鞭毛：周毛あり

細胞の多形成：なし

胞子の形成：なし

グラム染色：陰性

(2) 各培地における生育状況

肉汁寒天平板培養：非拡散性で光沢を有する、橙色の円形コロニーを形成する。

肉汁寒天斜面培養：非拡散性で光沢を有する、橙色の帯状に生育する。

肉汁液体培養：培地全体に均一に生育し、橙色を示す。

肉汁ゼラチン穿刺培養：ゼラチンを液化し、穿刺孔を中心に表面に生育する。

【0019】(3) 生理学的性質

硝酸塩の還元：陰性

脱窒反応：陰性

インドールの生成：陰性

クエン酸の利用：陰性

色素の生成：脂溶性の赤橙色色素

ウレアーゼ活性：陰性

オキシダーゼ活性：陰性

カタラーゼ活性：陰性

β -グルコシダーゼ活性 (エスクリン分解性)：陽性

β -ガラクトシダーゼ活性：陰性

生育の範囲：pH 5～9、温度10～40℃

酸素に対する態度：好気性

海水耐性：陽性

O-Fテスト：酸化、発酵のいずれも示さない。

糖類の同化能：

陽性：D-グルコース、麦芽糖

陰性：L-アラビノース、D-マンノース、D-マンニトール、N-アセチル-D-グルコサミン

有機酸の同化能：

陽性：リンゴ酸塩

陰性：グルコン酸塩、カプリン酸塩、アジピン酸塩、クエン酸塩、酢酸フェニル

他の有機物の分解・同化能

陽性：ゼラチン

陰性：L-アルギニン

【0020】*Hyphomonas* sp. PC-4 株の菌学的性質を以下に示す。

(1) 形態

菌の形・大きさ：球から短桿状、 $0.4\mu\text{m}$

運動性：あり

鞭毛：付着柄あり

細胞の多形成：なし

胞子の形成：なし

グラム染色：陰性

【0021】(2) 各培地における生育状況

肉汁寒天平板培養：ほとんど生育しない。

肉汁寒天斜面培養：ほとんど生育しない。

肉汁液体培養：ほとんど生育しない。

肉汁ゼラチン穿刺培養：ほとんど生育しない。

マリンアガー (Difco社製) 平板培養：非拡散性で光沢を有する、橙色の不定形コロニーを形成する。

マリンアガー (Difco社製) 斜面培養：非拡散性で光沢を有する、橙色の帯状に生育する。

マリンプロス (Difco社製) 培養：培地全体に均一に生育し、橙色を示す。

【0022】(3) 生理学的性質

硝酸塩の還元：陰性

脱窒反応：陰性

インドールの生成：陰性

クエン酸の利用：陰性

色素の生成：脂溶性の赤橙色色素

ウレアーゼ活性：陰性

オキシダーゼ活性：陽性

カタラーゼ活性：陽性

β -グルコシダーゼ活性 (エスクリン分解性) : 陰性

β -ガラクトシダーゼ活性 : 陰性

生育の範囲 : pH5~9、温度10~40℃

酸素に対する態度 : 好気性

海水耐性 : 陽性

O-Fテスト : 酸化、発酵のいずれも示さない。

糖類の同化能 :

陰性 : D-グルコース、麦芽糖、L-アラビノース、D-マンノース、D-マンニトール、N-アセチル-D-グルコサミン

有機酸の同化能 :

陰性 : グルコン酸塩、カプリン酸塩、アジピン酸塩、リンゴ酸塩、クエン酸塩、酢酸フェニル

他の有機物の分解・同化能

陰性 : ゼラチン、L-アルギニン

【0023】Caryophanon sp. PC-5株の菌学的性質を以下に示す。

(1) 形態

菌の形・大きさ : 桿状、 $0.5\mu\text{m} \times 2.5\mu\text{m}$

運動性 : あり

鞭毛 : 側毛あり

細胞の多形成 : なし

胞子の形成 : なし

グラム染色 : 陽性

【0024】(2) 各培地における生育状況

肉汁寒天平板培養 : 非拡散性で光沢を有する、橙色の円形コロニーを形成する。

肉汁寒天斜面培養 : 非拡散性で光沢を有する、橙色の帯状に生育する。

肉汁液体培養 : 培地全体に均一に生育し、橙色を示す。

肉汁ゼラチン穿刺培養 : 穿刺孔を中心に表面に生育する。

【0025】(3) 生理学的性質

硝酸塩の還元 : 陰性

脱窒反応 : 陰性

インドールの生成 : 陰性

クエン酸の利用 : 陰性

色素の生成 : 脂溶性の赤橙色色素

ウレアーゼ活性 : 陰性

オキシダーゼ活性 : 陽性

カタラーゼ活性 : 陽性

β -グルコシダーゼ活性 (エスクリン分解性) : 陽性

β -ガラクトシダーゼ活性 : 陰性

生育の範囲 : pH5~9、温度10~40℃

酸素に対する態度 : 好気性

海水耐性 : 陽性

O-Fテスト : 酸化、発酵のいずれも示さない。

糖類の同化能 :

陽性 : D-グルコース、麦芽糖

陰性 : L-アラビノース、D-マンノース、D-マンニ

トール、N-アセチル-D-グルコサミン

有機酸の同化能 :

陽性 : リンゴ酸塩

陰性 : グルコン酸塩、カプリン酸塩、アジピン酸塩、クエン酸塩、酢酸フェニル

他の有機物の分解・同化能

陰性 : ゼラチン、L-アルギニン

なお、前記の菌学的性質の決定は清水らの方法 (門田元、多賀信夫編、海洋微生物研究法、学会出版センター発行、pp. 229、1985年) に従った。形態学的検討は、光学顕微鏡を用い、特に胞子表面の形態については走査型電子顕微鏡によった。

【0026】前記の菌学的性質について、エヌ・アール・クリーグ (N. R. Krieg)、ジェイ・ジ・ホルト (J. G. Holt) 編、バージーズ・マニュアル・オブ・システムチック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) をもとに検索を行った結果、N-81106株をフラボバクテリウム (Flavobacterium) 属に帰属させるのが適当であったが、種を特定することは困難であり、N-81106株を *Flavobacterium* sp. N-81106

(微工研菌寄第12782号 (FERM P-12782)) として工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した (原寄託日 : 平成4年2月19日)。

【0027】PC-2株も同様に検索を行った結果、PC-2株をアルカリゲネス (*Alcaligenes*) 属に帰属させるのが適当であったが、種を特定することは困難であり、PC-2株を *Alcaligenes* sp. PC-2 (FERM P-13488) として工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した (原寄託日 : 平成5年3月2日)。PC-3株も同様に検索を行った結果、PC-3株をシュードモナス (*Pseudomonas*) 属に帰属させるのが適当であったが、種を特定することは困難であり、PC-3株を *Pseudomonas* sp. PC-3 (FERM P-13487) として工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した (原寄託日 : 平成5年3月2日)。

【0028】SD-402株も同様に検索を行った結果、SD-402株をアルテロモナス (*Alteromonas*) 属に帰属させるのが適当であったが、種を特定することは困難であり、SD-402株を *Alteromonas* sp. SD-402 (FERM P-13489) として工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した (原寄託日 : 平成5年3月2日)。PC-4株も同様に検索を行った結果、PC-4株をヒポモナス (*Hyphomonas*) 属に帰属させるのが適当であったが、種を特定することは困難であり、PC-4株を *Hyphomonas* sp. PC-4 (FERM P-13486) として工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した (原寄託日 : 平成5年3月2日)。

【0029】PC-5株も同様に検索を行った結果、PC-5株をカリオフィアノン (*Caryophanon*) 属に帰属させるのが適当であったが、種を特定することは困難であり、PC-5株を *Caryophanon* sp. PC-5 (FERM P-13485) として工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した (原寄託日 : 平

成5年3月2日)。本発明の製造法においては、前記微生物を一般に微生物の培養に用いられる培地で培養し、産生される4-ケトゼアキサンチンを常法により採取する。

【0030】まず培養法について述べる。前記微生物の培養には通常の培養方法を用いることができる。培地としては、資化可能な炭素源、窒素源、無機物及び必要な生育、生産促進物質を程よく含有する培地であれば、合成培地、天然培地いずれでも使用可能である。炭素源としては、グルコース、澱粉、デキストリン、マンノース、フルクトース、シュクロース、ラクトース、キシロース、アラビノース、マンニトール、糖蜜等が単独又は組み合わせて用いられる。更に、菌の資化能によっては炭化水素、アルコール類、有機酸類等も用いられる。窒素源としては、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、尿素、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、乾燥酵母、コーン・スチープ・リカー、大豆粉、カザミノ酸等が単独又は組み合わせて用いられる。そのほか、食塩、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、炭酸カルシウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、硫酸第一鉄、塩化カルシウム、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸銅等の無機塩類や海水又は天然海水中に存在する無機塩類を必要に応じて加える。また、4-ケトゼアキサンチン生合成上の前駆体と考えられる代謝マップ（日本生化学会編、東京化学同人発行、1980年）123～125頁記載のカロテン類又はその前駆体、エキネノン、カンタキサンチン、ゼアキサンチン、イドキサンチン、ペーターカロテントリオール等のキサントフィル類等を添加することができる。更に、使用菌の生育や4-ケトゼアキサンチンの生産を促進する微量成分を適当に添加することができる。

【0031】培養法としては、液体培養法、特に深部攪拌培養法が最も適している。培養温度は16～40℃、特に20～30℃が適当であり、培養中の培地のpHはアンモニア水や炭酸アンモニウム溶液等を添加して、4～10、特に6～8に維持することが望ましい。液体培養で通常1～7日培養を行うと、目的物質の4-ケトゼアキサンチンが菌体中に生成蓄積される。培養物中の生成量が最大に達したときに培養を停止する。

【0032】培養物からの4-ケトゼアキサンチンの単離精製は、微生物代謝生産物をその培養物から単離精製するために常用される方法に従って行われる。例えば、培養物をろ過や遠心分離により培養液と菌体に分け、菌体を有機溶剤（例えばヘキサン、ベンゼン、クロロホルム、アセトン、エーテル、酢酸エチル、エタノール又は以上の有機溶剤の含水物等）で抽出する。また、培養液中に4-ケトゼアキサンチンが存在する場合には、酢酸エチルやジエチルエーテル等の有機溶剤による抽出や、吸着型樹脂（Amberlite XAD-2等）に吸着後、適当な有機溶剤にて抽出物を得ることが可能である。ついで

抽出液を濃縮後、シリカゲル、化学結合型シリカゲル、ゲルろ過剤等を用いた液体クロマトグラフィーにより、4-ケトゼアキサンチンを分離、精製する。なお、培養、精製操作中の4-ケトゼアキサンチンの動向は薄層クロマトグラフィーによる4-ケトゼアキサンチンの橙色を目安として追跡することができる。

【0033】次に、4-ケトゼアキサンチンの養殖魚介類の色調改善剤としての用途について説明する。本発明における該有効成分は化学的に合成された4-ケトゼアキサンチンでも、また前記細菌を培養して得られる培養物の乾燥粉末、又は培養物を精製して得ることのできた4-ケトゼアキサンチンの抽出物であってもよい。また必要により適宜精製して使用することも可能である。

【0034】本発明の色調改善剤において、有効成分として培養物の粗抽出エキスあるいは精製した4-ケトゼアキサンチンを使用する場合、常法に従って前記有効成分を大豆油等に溶解して用いることができる。4-ケトゼアキサンチンを有効成分として含有する本発明の色調改善剤は、その安全性、色揚げ能及び色調改善能により主にエビ、マダイ等の養殖魚介類における色揚げ成分、並びにキンギョ、ニシキゴイ等の観賞魚の色調改善成分として有用である。

【0035】4-ケトゼアキサンチンの色調改善剤としての使用量は添加する対象魚介類により異なるが、例えばクルマエビに対しては5mg/餌料100g、ワキンに対しては2mg/餌料100gである。

【0036】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではないことはいうまでもない。

（実施例1）種菌として *Flavobacterium* sp. N-81106（微工研菌寄第12782号（FERM P-12782））を用いた。前培養及び本培養には、DIFCO社製「MARINE BROTH」を説明書記載の方法により調製した培地を適宜培養槽に分注し殺菌後用いた。前培養として、500ml容量の三角フラスコ中の150mlの培地に、該菌株を白金耳植菌し、25℃で48時間振とう（100rpm）培養した。このようにして得られた種培養液を、10L容量の培養槽中の前記組成と同一の組成の培地3Lに5%v/vの割合で移し、25℃で通気攪拌方式（回転数100rpm、通気量1L/分）により本培養を行った。培養中、培地のpHは特に制御しないで、120時間培養した。

【0037】培養液を遠心分離（10,000rpm）して菌体画分を得、アセトン200mlを添加し攪拌し、沈殿物をろ別し、抽出液を乾固した。これを更にシリカゲルカラム（ナカライテスク社製シリカゲル60）を用い、ヘキサン：アセトン＝7：3で展開した。溶出された画分Aを濃縮し4-ケトゼアキサンチン1.20mgを得た。このようにして得られた4-ケトゼアキサンチンは、水素核磁気共鳴スペクトル、可視部吸光スペクトル、質量分析にお

いて、公知のものと一致した。

【0038】(実施例2) 種菌として *Alcaligenes* sp. PC-2 (FERM P-13488) を用いた。前培養及び本培養には、DIFCO 社製「MARINE BROTH」を説明書記載の方法により調製した培地を適宜培養槽に分注し殺菌後用いた。前培養として、500ml 容量の三角フラスコ中の150ml の培地に、該菌株を一金耳植菌し、25℃で48時間振とう(100rpm)培養した。このようにして得られた種培養液を、10L 容量の培養槽中の前記組成と同一の組成の培地 3 L に 5 %v/v の割合で移し、25℃で通気攪拌方式(回転数100rpm、通気量 1L/分)により本培養を行った。培養中、培地のpHは特に制御しないで、120時間培養した。

【0039】培養液を遠心分離(10,000rpm)して菌体画分を得、アセトン200ml を添加し攪拌し、沈殿物をろ別し、抽出液を乾固した。これを更にシリカゲルカラム(ナカライテスク社製シリカゲル60)を用い、ヘキサン：アセトン＝7：3で展開した。溶出された画分Aを濃縮し4-ケトゼアキサンチン0.30mgを得た。このようにして得られた4-ケトゼアキサンチンは、水素核磁気共鳴スペクトル、可視部吸光スペクトル、質量分析において、公知のものと一致した。

【0040】(実施例3) 種菌として *Pseudomonas* sp. PC-3 (FERM P-13487) を用いた。前培養及び本培養には、DIFCO 社製「MARINE BROTH」を説明書記載の方法により調製した培地を適宜培養槽に分注し殺菌後用いた。前培養として、500ml 容量の三角フラスコ中の150ml の培地に、該菌株を一金耳植菌し、25℃で48時間振とう(100rpm)培養した。このようにして得られた種培養液を、10L 容量の培養槽中の前記組成と同一の組成の培地 3 L に 5 %v/v の割合で移し、25℃で通気攪拌方式(回転数100rpm、通気量 1L/分)により本培養を行った。培養中、培地のpHは特に制御しないで、120時間培養した。

【0041】培養液を遠心分離(10,000rpm)して菌体画分を得、アセトン200ml を添加し攪拌し、沈殿物をろ別し、抽出液を乾固した。これを更にシリカゲルカラム(ナカライテスク社製シリカゲル60)を用い、ヘキサン：アセトン＝7：3で展開した。溶出された画分Aを濃縮し4-ケトゼアキサンチン0.15mgを得た。このようにして得られた4-ケトゼアキサンチンは、水素核磁気共鳴スペクトル、可視部吸光スペクトル、質量分析において、公知のものと一致した。

【0042】(実施例4) 種菌として *Alteromonas* sp. SD-402 (FERM P-13489) を用いた。前培養及び本培養には、DIFCO 社製「MARINE BROTH」を説明書記載の方法により調製した培地を適宜培養槽に分注し殺菌後用いた。前培養として、500ml 容量の三角フラスコ中の150ml の培地に、該菌株を一金耳植菌し、25℃で48時間振とう(100rpm)培養した。このようにして得られた種培養液

を、10L 容量の培養槽中の前記組成と同一の組成の培地 3 L に 5 %v/v の割合で移し、20℃で通気攪拌方式(回転数100rpm、通気量 1L/分)により本培養を行った。培養中、培地のpHは特に制御しないで、120時間培養した。

【0043】培養液を遠心分離(10,000rpm)して菌体画分を得、アセトン200ml を添加し攪拌し、沈殿物をろ別し、抽出液を乾固した。これを更にシリカゲルカラム(ナカライテスク社製シリカゲル60)を用い、ヘキサン：アセトン＝7：3で展開した。溶出された画分Aを濃縮し4-ケトゼアキサンチン0.67mgを得た。このようにして得られた4-ケトゼアキサンチンは、水素核磁気共鳴スペクトル、可視部吸光スペクトル、質量分析において、公知のものと一致した。

【0044】(実施例5) 種菌として *Hyphomonas* sp. PC-4 (FERM P-13486) を用いた。前培養及び本培養には、DIFCO 社製「MARINE BROTH」を説明書記載の方法により調製した培地を適宜培養槽に分注し殺菌後用いた。前培養として、500ml 容量の三角フラスコ中の150ml の培地に、該菌株を一金耳植菌し、20℃で48時間振とう(100rpm)培養した。このようにして得られた種培養液を、10L 容量の培養槽中の前記組成と同一の組成の培地 3 L に 5 %v/v の割合で移し、25℃で通気攪拌方式(回転数100rpm、通気量 1L/分)により本培養を行った。培養中、培地のpHは特に制御しないで、120時間培養した。

【0045】培養液を遠心分離(10,000rpm)して菌体画分を得、アセトン200ml を添加し攪拌し、沈殿物をろ別し、抽出液を乾固した。これを更にシリカゲルカラム(ナカライテスク社製シリカゲル60)を用い、ヘキサン：アセトン＝7：3で展開した。溶出された画分Aを濃縮し4-ケトゼアキサンチン1.05mgを得た。このようにして得られた4-ケトゼアキサンチンは、水素核磁気共鳴スペクトル、可視部吸光スペクトル、質量分析において、公知のものと一致した。

【0046】(実施例6) 種菌として *Caryophanon* sp. PC-5 (FERM P-13485) を用いた。前培養及び本培養には、DIFCO 社製「MARINE BROTH」を説明書記載の方法により調製した培地を適宜培養槽に分注し殺菌後用いた。前培養として、500ml 容量の三角フラスコ中の150ml の培地に、該菌株を一金耳植菌し、25℃で48時間振とう(100rpm)培養した。このようにして得られた種培養液を、10L 容量の培養槽中の前記組成と同一の組成の培地 3 L に 5 %v/v の割合で移し、25℃で通気攪拌方式(回転数100rpm、通気量 1L/分)により本培養を行った。培養中、培地のpHは特に制御しないで、120時間培養した。

【0047】培養液を遠心分離(10,000rpm)して菌体画分を得、アセトン200ml を添加し攪拌し、沈殿物をろ別し、抽出液を乾固した。これを更にシリカゲルカラム

(ナカライテスク社製シリカゲル60)を用い、ヘキサン：アセトン＝7：3で展開した。溶出された画分Aを濃縮し4-ケトゼアキサンチン0.76mgを得た。このようにして得られた4-ケトゼアキサンチンは、水素核磁気共鳴スペクトル、可視部吸光スペクトル、質量分析において、公知のものと一致した。

【0048】(実施例7) 実施例1で得られた4-ケトゼアキサンチンについて、ワキンを用いた飼育試験を行った。試験飼料としては、市販されているテトラフィン(ドイツ、テトラベルケ社製)に対して、実施例1で得られた4-ケトゼアキサンチンの0.1%アセトン溶液を、4-ケトゼアキサンチンが2mg/飼料100gとなるように噴霧し、60℃の恒温乾燥器にて乾燥したものを用いた。コントロール餌料には、テトラフィンを用いた。

【0049】体長約2cmのワキン10匹を5匹ずつA、Bの2群に分け、各々縦27cm横16cm深さ16cmの水槽(水深12cm)で、昼光色蛍光灯(12時間点灯、12時間消灯)

下、室温で飼育した。最初の1週間は、両群ともにテトラフィン0.2g/日を投与した。2週目以降、A群には4-ケトゼアキサンチン含有のテトラフィン0.2g/日を、B群にはコントロール餌料のテトラフィン0.2g/日を投与した。その結果、A群は投与開始後2週間(飼育開始後3週間)頃より、コントロールと比較し体表の赤味が増し、投与開始後4週間(飼育開始後5週間)目では、コントロールであるB群と比較し、A群は有意に鮮やかな赤色になった。

【0050】

【発明の効果】本発明によれば、従来入手が困難であった4-ケトゼアキサンチンを、極く一般的な培養装置により、高収率で容易に得ることができる。本発明の色調改善剤は、エビ、マダイ等の養殖魚介類における色揚げ成分、及びキンギョ、ニシキゴイ等の鑑賞魚の色調改善成分として有用である。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:05)

(C 1 2 P 7/26

C 1 2 R 1:38)

(C 1 2 P 7/26

C 1 2 R 1:01)